

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 626 448 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
14.01.1998 Patentblatt 1998/03

(43) Veröffentlichungstag A2:
30.11.1994 Patentblatt 1994/48

(21) Anmeldenummer: 94107804.0

(22) Anmeldetag: 19.05.1994

(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/21, C12P 21/00,
C12N 15/62, C07K 14/56,
C12N 15/70

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL
PT SE

(30) Priorität: 26.05.1993 DE 4317459
03.09.1993 DE 4329756

(71) Anmelder:
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GmbH
55218 Ingelheim am Rhein (DE)

(72) Erfinder:

- Hauptmann, Rudolf, Dr.
A-2483 Ebrechsdorf (AT)
- Falkner, Edgar, Dr.
A-1130 Wien (AT)
- Bodo, Gerhard, Prof. Chem.
A-1120 Wien (AT)
- Voss, Tilman, Dr. Dipl.-Chem.
A-2340 Mödling (AT)
- Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.
A-1238 Wien (AT)

(54) **Verfahren zur Herstellung und Reinigung von alpha-Interferon**

(57) Die Erfindung betrifft ein neues Herstellungsverfahren für rekombinantes IFN- α . Die Expression in *E. coli* erfolgt unter Kontrolle eines *phoA*-Promotors. Durch die Verknüpfung des IFN- α -Gens mit der STII-Signalsequenz wird die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum sowie ein korrekt prozessierter N-Terminus erreicht. Die Reinigung des Proteins erfolgt durch Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- sowie Anionenaustauschchromatographie.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 94 10 7804

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.CI.5)
X	EP 0 177 343 A (GENENTECH, INC.) *Seiten 7-12, insbesondere die Tabelle 1; Patentansprüche*	1-3, 8, 9, 17-23	C12N15/21 C12P21/00 C12N15/62 C07K14/56 C12N15/70
A	EP 0 170 266 A (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) *Seiten 12-16; Beispiel 2; Patentansprüche*	1	
P, X	BIOCHEM. J., Bd. 298, 1994, Seiten 719-25, XP002041430 T. VOSS ET AL.: "Periplasmic expression of human interferon-alpha-2c in Escherichia coli results in a correctly folded molecule" *das gesamte Dokument*	1-9, 17-23	
A	WO 92 01055 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) *Beispiel 6; Abbildung 15; Patentansprüche*	1, 4	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.CI.5) C12N C07K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 23. September 1997	Prüfer Yeats, S
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : Älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			



Europäisches Patentamt

GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden,
nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich

Siehe Ergänzungsblatt -B-

- ☐ Alle weiteren Recherchegebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchegebühren entrichtet worden sind.
nämlich Patentansprüche:
- ☒ Keine der weiteren Recherchegebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen,
nämlich Patentansprüche: 1-9,17-23



Europäisches
Patentamt

**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT
DER ERFINDUNG
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung

EP 94 10 7804

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Ansprüche: 1-9, 17-23

Verfahren zur Herstellung von Interferon-alpha durch
Expression in E. coli und Vektor dafür.

2. Ansprüche: 10-16

Verfahren zur Reinigung von Interferon-alpha durch
Chromatographie.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 626 448 A2**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 94107804.0

51 Int. Cl. 5: C12N 15/21, C12P 21/00,
C12N 15/62

22 Anmeldetag: 19.05.94

30 Priorität: 26.05.93 DE 4317459
03.09.93 DE 4329756

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
30.11.94 Patentblatt 94/48

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

71 Anmelder: BOEHRINGER INGELHEIM
INTERNATIONAL GmbH
Postfach 200
D-55216 Ingelheim (DE)

72 Erfinder: Hauptmann, Rudolf, Dr.
Döllachgasse 22
A-2483 Ebrechsdorf (AT)
Erfinder: Falkner, Edgar, Dr.
Linienamtsgasse 4/2/14
A-1130 Wien (AT)
Erfinder: Bodo, Gerhard, Prof. Chem.
Hetzendorfer Strasse 116/1/4
A-1120 Wien (AT)
Erfinder: Voss, Tilman, Dr. Dipl.-Chem.
Weisses-Kreuz-Gasse 61
A-2340 Mödling (AT)
Erfinder: Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.
Lindauergasse 35
A-1238 Wien (AT)

54 Verfahren zur Herstellung und Reinigung von alpha-Interferon.

57 Die Erfindung betrifft ein neues Herstellungsverfahren für rekombinantes IFN- α . Die Expression in *E. coli* erfolgt unter Kontrolle eines *phoA*-Promotors. Durch die Verknüpfung des IFN- α -Gens mit der STII-Signalsequenz wird die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum sowie ein korrekt prozessierter N-Terminus erreicht. Die Reinigung des Proteins erfolgt durch Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- sowie Anionenaustauschchromatographie.

Die Erfindung betrifft ein Herstellungsverfahren für Interferon- α (IFN α) durch bakterielle Expression und anschließende Isolierung, einen Expressionsvektor dafür sowie ein Verfahren zur Reinigung von IFN α .

Verfahren zur Herstellung von IFN α durch bakterielle Expression sind bekannt. Das übliche Verfahren beruht auf der cytoplasmatischen Expression des Proteins in *Escherichia coli*, bei dem das exprimierte IFN α entweder in unlöslicher Form in sogenannten Einschußkörpern in der Zelle vorliegt oder in der löslichen Fraktion nach dem Aufschließen der Zellwand gefunden wird (Thatcher *et al.* Panayotatos, 1986; Goeddel *et al.*, 1980; Dworkin-Rastl *et al.*, 1983). Die cytoplasmatische Expression weist allerdings Nachteile auf. Das synthetisierte Protein ist nicht korrekt gefaltet, und weil im Zytoplasma reduzierende Bedingungen herrschen, enthält es nicht die erforderlichen Disulfidbrücken. Das gebildete IFN α muß daher bei der Präparation oxidiert und umgefaltet werden. Dieser Prozeß ist ineffizient und führt zu unerwünschten Nebenprodukten (ganz- oder teilreduzierte Formen, Oligomere durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung, fehlgefaltete Formen durch Ausbildung falscher Disulfidbrücken), die schwierig abzutrennen sind. Ein weiteres Problem ist, daß das N-terminale Methionin, mit dem die Translation beginnt, vom intrazellulär synthetisierten IFN α nur unvollständig abgespalten wird. Das daraus resultierende N-Met-IFN α kann vom nativen IFN α praktisch nicht abgetrennt werden.

Ein weiterer Nachteil gegenwärtig benutzter Verfahren ist die Verwendung von Promotoren, die in nicht-induziertem Zustand nicht vollständig abgeschaltet sind, die durch Zugabe von Chemikalien induziert werden müssen und deren Expressionsrate im induzierten Zustand nicht befriedigend ist, wie z.B. der *trp*-Promotor aus *Serratia marcescens*.

Um einige der genannten Nachteile zu überwinden und trotzdem das ökonomische *E. coli*-System zu nutzen, versuchten Breitling *et al.* (Breitling *et al.*, 1989) IFN α 1 und ein IFN α 1/2-Hybrid mit einem Vektor zu exprimieren, der die Sekretion des Interferons durch die Zellmembran in den periplasmatischen Raum ermöglichte. Sie verwendeten dabei Promotor, Ribosomenbindungsstelle (RBS) und Signalsequenz eines bakteriellen Stickstoffkinasogens (*sak*42D). 60-80% des so hergestellten IFN α wurden in den periplasmatischen Raum sekretiert. Das Protein enthielt allerdings, bedingt durch das Vektorkonstrukt, zusätzliche N-terminale Aminosäuren, die im entsprechenden nativen IFN α nicht vorkommen. Als gravierender Nachteil dieses Expressionssystems erwies sich indes die Tatsache, daß die mit diesem Konstrukt transformierten Stämme genetisch nicht stabil blieben; die Expressionskassette wurde durch die spontane Insertion eines IS1-Elements inaktiviert. Die Aufgabe, ein Expressions/Sekretionssystem in *E. coli* für die Herstellung von humanem IFN α herzustellen, war im Stand der Technik also ungelöst.

Als eine Expressions/Sekretions-Kassette, die im Falle der Expression des menschlichen Wachstumsfaktor-Rezeptors in *E. coli* zum Erfolg geführt hatte, war ein Konstrukt aus dem Promotor der alkalischen Phosphatase (*phoA*) und der Signalsequenz des hitzestabilen Enterotoxins II (STII) bekannt (Fuh *et al.*, 1990).

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von rekombinantem IFN α in *E. coli* ist die Reinigung des Proteins aus dem Bakterienlysat. Hier sind eine Reihe von Verfahren bekannt (Thatcher *et al.* Panayotatos, 1986; EP-A 396 555). Um die native Faltung des Proteins zu erhalten, sind dabei Verfahren vorzuziehen, die ohne Denaturierungsschritte und Fällungsschritte auskommen. Ein solches Verfahren wird in der EP-A 396 555 beschrieben. Es besteht aus den Schritten Immunoaffinitätschromatographie, Reversed-Phase-Chromatographie oder Ionenaustauschchromatographie, Konzentrierung durch Ultrafiltration und Gelfiltrationschromatographie. Dieses Verfahren beruht wie andere bekannte Verfahren auf der hohen Selektivität der Immunoaffinitätschromatographie im ersten Schritt. Es ist kein Verfahren zur Herstellung von hochgereinigtem IFN α . Bekannt ist IFN α 2, bekannt, das ohne Denaturierungs-/Fällungsschritte und ohne Immunoaffinitätschromatographie auskommt. Gleichzeitig ist ein solches Verfahren aus ökonomischen und technischen Gründen wünschenswert. Wegen der für die Immunoaffinitätschromatographie notwendigen monoklonalen Antikörper sind die Kosten hoch, gleichzeitig ist, da die Lebensdauer der antikörpergekoppelten Matrices endlich ist, eine ständige Versorgung mit diesen Antikörpern notwendig.

Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines wirtschaftlicheren und leistungsfähigeren Verfahrens zur Herstellung von Interferon- α , insbesondere Interferon- α 2, durch rekombinante Expression in *E. coli*. Dabei muß das Problem gelöst werden, ein effizientes und stabiles System zur Expression/Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum oder das Kulturmedium zu etablieren. Ferner war ein Verfahren zu entwickeln, das das exprimierte Protein schonend ohne Denaturierungs-/Fällungsschritte und ohne die Notwendigkeit der Immunoaffinitätschromatographie hochreinigen kann.

Diese Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung gelöst werden. Die Etablierung eines stabilen Expressions/Sekretionssystems für IFN α in *E. coli* gelang durch die Konstruktion eines Vektors, der die Signalsequenz (Steuersequenz) des hitzestabilen Enterotoxins II (STII) aus *E. coli* verknüpft mit der kodierenden Sequenz für ein reifes menschliches Interferon- α , vorzugsweise Interferon- α 2, enthält. Bevorzugt erfolgt die Expressionskontrolle mittels des Promotors der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (*phoA*).

Als vorteilhaft erwies sich ferner die Integration der Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens. Ein weiterer überraschender Fortschritt konnte durch die Bereitstellung eines Reinigungsverfahrens für Interferon- α , das aus den Schritten Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Kationenaustauschchromatographie und Anionenaustauschchromatographie besteht, erreicht werden.

5 Ein Aspekt der Erfindung betrifft somit ein Verfahren der Herstellung von IFN α durch bakterielle Expression, bei dem transformierte Bakterienzellen verwendet werden, die einen Expressionsvektor enthalten, in dem die STII-Signalsequenz mit einem IFN α -Gen verknüpft ist, und durch Isolierung des exprimierten IFN α . Ein weiterer Aspekt betrifft einen bakteriellen Expressionsvektor für die Herstellung von IFN α , der ein Konstrukt aus der Signalsequenz des STII-Gens und einem IFN α -Gen enthält, sowie die Verwendung
10 eines solchen Vektors zur Herstellung von IFN α . Ein dritter Aspekt betrifft ein Verfahren zur Reinigung von IFN α durch die chromatographischen Schritte Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- sowie Anionenaustauschchromatographie.

Als Ausgangspunkt für die Konstruktion des Vektors kann ein in *E. coli* replikationsfähiges Plasmid dienen, beispielsweise eignet sich das Plasmid pAT153 (Twigg *et al.*, 1980) sehr gut für diesen Zweck.
15 Eine Nukleotidsequenz, die für das Signalpeptid des STII-Gens kodiert, ist Stand der Technik (Picken *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1983). Der Fachmann ist in der Lage, durch Mutationen (Substitution, Deletion, Insertion, Addition) Varianten dieser Sequenz herzustellen, ohne ihre Grundeigenschaften zu verändern, und insbesondere solche Nukleotidsequenzen herzustellen, die wegen der Degeneration des genetischen Codes für die gleiche Aminosäuresequenz des Signalpeptids kodieren (Sambrook *et al.*, 1989, bes. Kapitel 15). Eine
20 ganze Reihe von Sequenzen, die für Mitglieder der IFN α -Familie kodieren, ist bekannt (Mantei *et al.*, 1980; Streuli *et al.*, 1980; Goeddel *et al.*, 1981); die Homologie der sie kodierenden Gene beträgt mehr als 70 %. Weitere Varianten dieser Sequenzen können in der Natur gefunden werden oder mit Methoden aus dem Stand der Technik, z.B. durch Mutagenese, aus den bekannten Sequenzen hergestellt werden (Sambrook *et al.*, 1989, bes. Kapitel 15). Der Begriff "IFN α " im Sinne der Erfindung schließt demzufolge neben den
25 bekannten Sequenzen auch solche Varianten ein, deren Gene durch hohe Homologie zu den bekannten Sequenzen gekennzeichnet sind und die für biologisch aktives IFN α kodieren. Besonders bevorzugt ist dabei die Sequenz, die für IFN α 2c kodiert (Dworkin-Rastl *et al.*, 1983; Bodo *et al.*, 1985). Besonders bevorzugt ist ferner die Verwendung des *phoA*-Promotors zur Kontrolle der Expression und darüber hinaus vorteilhaft die Integration der Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens. Die Sequenz des *phoA*-Promotors
30 (Chang *et al.*, 1986; Shuttleworth *et al.*, 1981) sowie der STII-Ribosomenbindungsstelle (Picken *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1983) sind bekannt; auch aus diesen Sequenzen kann der Fachmann ohne weiteres äquivalente Varianten herstellen. Konstruktion des Vektors, Transformation geeigneter *E. coli*-Stämme, Fermentation sowie Extraktion können nach an sich bekannten Methoden erfolgen (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Expression ist beispielsweise der *E. coli*-Stamm W3110 (*E. coli* K12 Wildtyp f^- , λ^- , IN (rmD-rnE1))
35 gut geeignet. Die Vorkultur kann gut in LB-Medium, die Hauptkultur unter Kontrolle von Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr bis zu einer OD₅₄₆ von 250 bis 280 erfolgen. Als gut geeignet erwies sich ein Extraktionsverfahren, bei dem säureinaktivierte Biomasse in verdünnter Essigsäure mit Hilfe eines Homogenisators suspendiert, mit Polyethylenimin, bevorzugt in einer Konzentration von 0.25% (w/v) versetzt, auf alkalischen pH, vorzugsweise pH 10, eingestellt, gerührt und anschließend durch Zentrifugation die Bakterien abge-
40 trennt wurden. Die Reinigung kann nach an sich bekannten Verfahren erfolgen (Thatcher *et al.*, 1986; EP-A 203 382). Besonders vorteilhaft ist jedoch ein Reinigungsverfahren mit vier chromatographischen Schritten, und zwar Adsorptionschromatographie auf Silicagel, hydrophobe Interaktionschromatographie, Kationen- und Anionenaustauschchromatographie. Als Gelbett der Silicachromatographie erwies sich das vom Typ 953W der Firma Grace gut geeignet, als Elutionsmittel war ein Puffer, der 500 - 1500 mM
45 Tetramethylammoniumchlorid (TMAC), bevorzugt 800 mM TMAC, vorteilhaft verwendbar. Für die hydrophobe Interaktionschromatographie erwies sich eine Phenylsepharose als gut zu verwendendes Gelbett. Der Probenauftrag erfolgte vorzugsweise in Anwesenheit von 20% Ammoniumsulfat, die Säule war mit einem Puffer, der 30% Ammoniumsulfat enthielt, equilibriert worden. Das IFN α wurde mit einem linearen Gradienten mit einer Endkonzentration von 30% Ethylenglykol eluiert. Die Kationenaustauschchromatographie
50 konnte sehr gut mit einem Sulfopropyl-Ionenaustauscherharz ausgeführt werden. Der Probenauftrag erfolgte bei einem pH-Wert von 3-5, vorzugsweise pH 3, die Säule war auf pH 5 equilibriert. IFN α konnte erfolgreich mit einem linearen Kochsalzgradienten mit einem Zusatz von 10% Ethylenglykol eluiert werden. Als Gelbett für die Anionenaustauschchromatographie war DEAE-Sepharose sehr vorteilhaft zu verwenden, Auftrag und Elution erfolgten bei pH 5.5 - 6.0, vorzugsweise bei pH 5.8. Zur Elution war ein linearer Kochsalzgradient mit einem Zusatz von 0.1% Tween 20 gut geeignet. Es gehört zu den technischen Möglichkeiten des
55 Fachmanns, ohne erfinderische Tätigkeit jeweils eines oder mehrere Gelmaterialien durch gleichwertige zu ersetzen, die auf den gleichen Trennprinzipien basieren, und auf diese Weise das erfindungsgemäße

Überraschenderweise konnte mit der Verknüpfung der STII-Signalsequenz mit dem IFN α -Gen ein stabiles Expressions/Sekretionssystem etabliert werden, was mit der vorbeschriebenen sak42D-Leader/IFN α -Kombination nicht gelungen war. Als besonders erfolgreich erwies sich die Expression dieser Sequenz unter der Kontrolle des *phoA*-Promotors. Die Integration der Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens erwies sich in diesem Zusammenhang als zusätzlich vorteilhaft. Die Expression kann über die Kontrolle der Phosphatkonzentration im Medium (Phosphatmangel aktiviert den *phoA*-Promotor) zuverlässig gesteuert werden; im inaktivierten Zustand gibt es keine nachweisbare Basalexpression. Zusätzliche Chemikalien brauchen zur Aktivierung nicht zugegeben zu werden, die Expressionsrate im aktivierten Zustand ist hoch. Das synthetisierte Protein wird in hohen Anteilen in den periplasmatischen Raum sezerniert. Das sezernierte Protein ist korrekt gefaltet, enthält den authentischen N-Terminus und die richtigen Disulfidbrücken. Die SDS-Gelanalyse der Expression in *E. coli* W3110 zeigte, daß 30-50% des synthetisierten IFN α korrekt prozessiert waren, dies entspricht praktisch dem kompletten Anteil des sezernierten Proteins.

Mit dem in Beispiel 3 beschriebenen Extraktionsverfahren konnten $29.3 \pm 5.9\%$ des insgesamt in der Biomasse nachweisbaren IFN α 2c extrahiert werden. Dies entsprach dem beobachteten Prozessierungsgrad von 30-50%. Der Extrakt aus der Biomasse enthielt $4.5 \pm 1.8\%$ IFN α 2c, bezogen auf Gesamtprotein. Die Silica-Adsorptionschromatographie führte zu einem IFN α 2c-Pool mit einer durchschnittlichen Reinheit von $16.7 \pm 4.4\%$. Die Phenyl-Sepharose-Chromatographie mit einer Ausbeute von $93.2 \pm 7.3\%$ ergab ein IFN α 2c mit einer Reinheit von $71.2 \pm 15.5\%$. Die Sulfopropyl-Ionenaustauschchromatographie erbrachte eine Ausbeute von $70.9 \pm 14.8\%$ und eine Reinheit von $97.6 \pm 4.6\%$. Der letzte Schritt, die DEAE-Ionenaustauschchromatographie, führte bei einer Ausbeute von $86.9 \pm 9.2\%$ zu 100% reinem IFN α 2c, wie unten charakterisiert. Die Daten aus 6 verschiedenen Reinigungen sind in den Tabellen 1 (Ausbeuten) und 2 (IFN α 2c-Gehalt) zusammengefaßt. Fig. 3 zeigt charakteristische Chromatogramme von jedem Reinigungsschritt.

Aus 1 kg Biomasse wurden 340 ± 100 mg gereinigtes IFN α 2c erhalten. Die Ausbeute des Reinigungsprozesses ist $56.1 \pm 22.2\%$. Die Gesamtausbeute, bezogen auf den IFN α 2c-Gehalt der Biomasse ist 14.4%. Diese Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Fig. 4 zeigt eine typische SDS-PAGE von gereinigtem IFN α 2c, eluiert beim letzten chromatographischen Schritt. Die 18-kDa-Bande von IFN α 2c ist die einzige sichtbare Bande. Kontaminierende Banden werden nicht beobachtet. Fig. 5A zeigt ein typisches Reversed-Phase-HPLC-Chromatogramm. Das gereinigte IFN α 2c eluiert als homogener Peak bei 24.8 Minuten. Wurde dieses Material mit einem flachen Acetonitrilgradienten eluiert (Fig. 5B), wurden 2 Kontaminationspeaks an beiden Seiten des Hauptpeaks beobachtet. Diese Schultern, die etwa 1.8% des Gesamt-IFN α 2c-Gehaltes enthalten, repräsentieren Formen, die am Methionin 111 oxidiert (erste Schulter) oder am N-Terminus acetyliert (zweite Schulter) sind.

Tabelle 1: Ausbeuten verschiedener Reinigungsschritte in Prozent IFN α 2, die nach dem jeweiligen Reinigungsschritt erhalten wurden, dargestellt für 6 verschiedene Reinigungsprozeduren (p1-p6) aus 6 verschiedenen Biomassen. Die letzten beiden Spalten enthalten den Mittelwert (M) und die Standardabweichung (sd)

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	M	sd
Extrakt	37.9	24.0	34.3	30.7	29.1	20.0	29.3	5.9
Silica	62.0	95.8	88.2	99.5	74.1	81.0	83.4	12.8
Phenyl	100.0	82.2	85.9	100.0	100.0	91.0	93.2	7.3
Sulfopro	64.0	54.3	76.5	100.0	60.0	71.0	70.9	14.8
DEAE	95.0	100.0	83.5	88.2	84.0	71.0	86.9	9.2

Tabelle 2: IFN α 2-Gehalt verschiedener Reinigungsschritte. Die Daten sind als Prozentsatz des IFN α 2-Gehalts, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, der bei diesem Reinigungsschritt erhalten wurde, so dargestellt wie in Tabelle 1.

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	M	sd
Extrakt	8.0	2.1	4.1	4.7	3.6	4.4	4.5	1.8
Silica	12.9	11.6	15.7	15.7	19.4	15.6	16.7	4.4
Phenyl	76.6	43.3	62.9	62.9	80.0	93.5	71.2	15.5
Sulfopro	98.5	87.3	100.0	100.0	100.0	100.0	97.6	4.6
DEAE	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0

Tabelle 3: Gesamtausbeuten des Reinigungsverfahrens. Der IFN α 2c-Gehalt der Biomasse ist als g IFN α 2/kg Biomasse dargestellt. Prozessierung und Extraktion sind als Prozentsatz des Gesamtgehalts an IFN α 2 ausgedrückt. Die Ausbeute der Reinigung ist dargestellt als Prozentsatz von IFN α 2c relativ zum IFN α 2-Gehalt des Extrakts. Die Gesamtausbeute ist in mg IFN α 2, erhalten pro kg Biomasse, und als Prozentsatz von gereinigtem IFN α 2c, bezogen auf den IFN α 2c-Gehalt des Extrakts, ausgedrückt.

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	M	sd
Biomasse [g/kg]	1.4	1.0	1.1	1.5	1.1	1.8	1.3	0.2
Prozessierung [%]	50	40	40	40	20	40	38.3	8.9
Extraktion [%]	37.9	24.0	34.3	30.7	29.1	20.0	29.3	4.7
Reinigung [%]	39.7	42.7	57.9	90	44.5	52.3	56.1	22.2
Gesamtausbeute [mg]	538	206	366	480	280	258	340	120
Gesamtausbeute [%]	14.3	20.3	16.6	23.9	10.9	7.4	14.4	6.9

Abbildungen

Fig. 1:

- A) Genkarte von pCF2. Das *EcoRI*-*Bam*HI-Fragment von pAT153 wurde durch die Expressionskassette für IFN ω 1 ersetzt.
 B) Sequenz des *EcoRI*(zerstört)-*Bam*HI-Teils, der den *phoA*-Promotor, STII-Leader + IFN ω 1-Gen enthält.

Fig. 2:

- A) Genkarte des Plasmids pDH13. Das *Ssp*I-*Pst*II-Fragment von pAT153 wurde durch die IFN α 2c-Expressionskassette (*Eco*RI-*Pst*II-Fragment von 2P) ersetzt. Das 2. Lastmarker-Gen

B) Nukleotidsequenz des *EcoRI-HindIII*-Inserts von pDH13.

Fig. 3: Chromatographische Reinigung von IFN α 2c, extrahiert aus Biomasse.

A) Adsorptionschromatographie auf Silicagel. Der Pfeil zeigt die Elution mit 800 mM Tetramethylammoniumchlorid an.

B) Hydrophobe Interaktionschromatographie auf Phenylsepharose. Die Elution wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100% Lösungsmittel B wie angezeigt (----) durchgeführt.

C) Sulfopropyl-Kationenaustauschchromatographie. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0 bis 100% Lösungsmittel B wie angezeigt (----) ausgeführt.

D) Anionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephadex. Die Elution wurde mit einem Gradienten von 0 bis 100% Lösungsmittel B wie angezeigt (----) durchgeführt.

Die Balken unter den Hauptpeaks in jedem Chromatogramm zeigen die IFN α 2-haltigen Pools an, die gesammelt und für die folgenden Schritte verwendet wurden.

Fig. 4: SDS-PAGE von gereinigtem IFN α 2c, gefärbt mit Coomassie Blue. Die Zahlen am linken Rand zeigen die Molekulargewichte der Standardproteine an.

Spur 1: IFN α 2c-Standard

Spur 2: 3 μ g IFN α 2c

Spur 3: 6 μ g IFN α 2c

Spur M: Molekulargewichtsstandard

Fig. 5: Charakterisierung von gereinigtem IFN α 2c durch Reversed Phase HPLC.

A) Elution von IFN α 2c mit einem linearen Gradienten von 20-68% Lösungsmittel B in 24 Minuten.

B) Elution von IFN α 2c mit einem linearen Gradienten von 45-53% Lösungsmittel B in 30 Minuten.

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung des Expressionsvektors pDH13 sowie damit transformierter Zellen

Allgemeine Methoden

Restriktionsverdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Auffüllreaktionen, Phenolextraktion und Fällung von DNA, Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarosegelen, Ligation von DNA-Molekülen, Transformation von Bakterien und Plasmidisolierung aus Bakterien sind Standardverfahren und wurden durchgeführt wie von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

Plasmide

pCF2 pCF2 wurde aus dem Plasmid pAT153 (Twigg *et al.*, 1980) hergestellt. Es enthält den Promotor der alkalischen Phosphatase aus *E. coli* (*phoA*, Chang *et al.*, 1986; Schuttleworth *et al.*, 1986), die kodierende Region des STII-Leaderpeptids (Picken *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1983) sowie das Gen für menschliches IFN ω 1 (Hauptmann *et al.*, 1985). Fig. 1 zeigt die Genkarte von pCF2 sowie die Sequenz des relevanten Abschnitts.

pER21/1 pER 21/1 ist ein bakterieller Expressionsvektor für IFN α 2c, dessen Herstellung in der EP 0 115 613 beschrieben wird.

Oligonukleotide (5' \rightarrow 3'):

EBI-2787: CGTCTTCAAGAATTCGAGATTATCG
EBI-2799: GGCAGATCACATGCATAGGCATTTGTAGCAATAG
EBI-2798: ATGCCTATGCATGTGATCTGCCTCAAACCCACAGC
EBI-2797:

GACTTCAGAAGCTTCTGCAGTTACGATCGTTATCATTCTTAC
TTCTTAAACTTTC

Herstellung der Expressionskassette aus *phoA*-Promotor, *IFN α 2c*-Sequenz und *STII*-Leadersequenz in einer Zweischritt-PCR

pER21/1-DNA wurde mit *HindIII* linearisiert, pCF2-DNA mit *PvuI*. Die im folgenden verwendete Methode ist als SOE-PCR beschrieben ("splicing by overlap extension", Ho *et al.*, 1989).

PCR 1a (Amplifikation des *IFN α 2c*-Gens): 100 ng linearisierter pER21/1-DNA, 25 pmol EBI-2797 und 25 pmol EBI-2798 wurden in 50 μ l Puffer, der 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% Gelatine, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP und 1.25 Einheiten *Taq*-Polymerase enthielt, in einem Perkin Elmer Cetus Thermocycler TC-1 Thermozyklen unterworfen. Nach 3 min Inkubation bei 94°C wurden 10 Stufenzyklen (Stufe 1: 40 sec bei 94°C, Stufe 2: 30 sec bei 55°C, Stufe 3: 90 sec bei 72°C) ausgeführt.

PCR 1b (Amplifikation von *phoA*-Promotor plus *STII*-Leadersequenz): 100 ng linearisierter pCF2-DNA, 25 pmol EBI-2787 und 25 pmol EBI 2799 wurden im gleichen Puffer und unter gleichen Bedingungen wie unter PCR 1a beschrieben Thermozyklen unterworfen.

Die resultierenden DNA-Fragmente von PCR 1a (540bp) und PCR 1b (374 bp) wurden gelgereinigt (1.2% low gelling type Agarose in TBE-Puffer, 1 x TBE: 10.8 g Tris/l, 5.5 g Borsäure/l, 0.93 g EDTA/l). Das Agarosestückchen, das das jeweilige DNA-Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten und die Agarose geschmolzen, indem 100 μ l H₂O zugegeben und auf 70°C erhitzt wurde.

PCR 2: 5 μ l von jeder Agarose/DNA-Lösung wurden vereinigt und in 100 μ l Lösung, die jeweils 50 pmol von EBI-2787 und EBI-2797 enthielt, Thermozyklen unterworfen. Der Puffer war der gleiche wie unter PCR 1a beschrieben. Das Thermozyklusgerät wurde so programmiert, daß an eine Verzögerungszeit von 5 min bei 94°C 20 Stufenzyklen (Stufe 1: 40 sec bei 94°C, Stufe 2: 30 sec bei 55°C, Stufe 3: 5 min bei 72°C; Stufe 3 wurde bei jedem neuen Zyklus um 5 Sekunden verlängert) angeschlossen wurden. Nach der Amplifikation wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation gereinigt. Das PCR-Produkt wurde aufgelöst und mit *HindIII* und *EcoRI* in den entsprechenden Puffern geschnitten.

Klonierung des PCR-Produktes (pDH9)

Bluescribe M13⁺ (Stratagene, San Diego, CA, USA) wurde mit *HindIII* und *EcoRI* doppelt geschnitten und das große Fragment wurde mit einem 1.2%igen Agarosegel gelgereinigt. 10 ng Bluescribe M13⁺ DNA und 50 ng mit *EcoRI/Hind III* geschnittenes PCR-Produkt wurden in 10 μ l Lösung, die 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 20 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 50 μ g/ml Rinderserumalbumin (BSA) und 2 Einheiten T4-DNA-Ligase (NEN) enthielt, 1 Stunde bei 0°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur ligiert. 8 μ l dieser Lösung wurden für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen vom Stamm JM 101 (*E. coli* K12, *SupE*, *thi*, Δ (*lac*-*proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI* Δ M15]) verwendet.

Ein Klon wurde ausgewählt, die DNA isoliert und die Expressionskassette sequenziert. Die Sequenz entsprach genau der theoretisch erwarteten Sequenz (Fig. 2). Das Plasmid wurde als pDH9 bezeichnet.

Konstruktion des Expressionsplasmids pDH13

pAT153 wurde mit *SspI* und *PstI* doppelt geschnitten und das große Fragment wurde isoliert. pDH9 wurde mit *EcoRI* geschnitten und die Enden aufgefüllt unter Verwendung des Klenowfragments der DNA-Polymerase I und der 4 dNTPs. Nach Phenolextraktion und Fällung der linearen pDH9-DNA wurde diese DNA mit *PstI* geschnitten und das Fragment, das den *phoA*-Promotor, die *STII*-Leadersequenz und das *IFN α 2c*-Gen enthielt, aus einem 1%igen Agarosegel isoliert.

10 ng pAT153 x *SspI* x *PstI* und 30 ng des Fragments, das die Expressionskassette enthielt, wurden in 10 μ l Lösung für 5 Stunden bei Raumtemperatur ligiert. 5 μ l von diesem Ansatz wurden verwendet, um kompetente *E. coli*-Bakterien des Stammes HB101 zu transformieren. Die Selektion der transformierten Bakterien wurde auf LB-Agarplatten (10 g Trypton/l, 5 g Hefeextrakt/l, 5 g NaCl/l, 15 g Bacto-Agar/l) durchgeführt, die 10 μ g/ml Tetracyclin enthielten. Eine Genkarte von pDH13 und die Sequenz der relevanten Region ist in Fig. 2 dargestellt.

Plasmid-DNA verschiedener so erhaltener Kolonien wurde isoliert und durch Restriktionsanalyse auf korrekte Zusammensetzung überprüft. Ein Plasmid wurde ausgewählt und als pDH13 bezeichnet. Das Plasmid pDH13 wurde zur Transformation von *E. coli* W3110 (*E. coli* K12 Wildtyp, *f'*, λ^- , IN (*rrnD*-*rrnE*)) verwendet.

Beispiel 2: Fermentation

Vorkultur

- 5 700 ml autoklaviertes LB-Medium (10 g Bacto-Trypton/l, 5 g Bacto-Hefeextrakt/l, 10 g NaCl/l, pH 7.0), das 5 mg/l Tetracyclin enthielt, wurden in einem 2l-Glasgefäß aus einer Stockkultur so beimpft, daß eine OD_{546} von 0.01 erhalten wurde. Die Kultur wurde 10 Stunden bei 37 °C unter starkem Rühren (800 U/min) und Belüftung (5 Fermentervolumina pro Minute [vvm]) inkubiert.

10 Hauptkultur

Mediumzusammensetzung

im Fermenter:

- 15 1.21 g/l $(NH_4)_2HPO_4$
 3.96 g/l $(NH_4)_2SO_4$
 6.53 g/l K_2HPO_4
 1.23 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$
 20 0.32 g/l NaCl
 0.25 g/l NH_4Cl
 1.0 g/l Na_3 -Citrat $\times 2 H_2O$
 1.0 ml/l Spurenelementekonzentrat
 12.5 g/l Glucose
 25 20 mg/l Thiamin-HCl
 50 mg/l L-Tryptophan
 100 mg/l L-Leucin
 50 mg/l L-Methionin
 5 mg/l Tetracyclin

30

Spurenelementekonzentrat:

(Mengenangaben pro 100 ml)

- 35 3.35 g $FeCl_3 \times 6 H_2O$
 1.09 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
 0.267 g $CoCl_2 \times 6 H_2O$
 0.267 g $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$
 0.221 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$
 40 0.333 g H_3BO_3
 1.37 g $MnSO_4 \times H_2O$
 10 ml HCl conc.
 H_2O ad 100 ml

45 Fütterung während der Fermentation:

(Mengen bezogen auf Fermentervolumen)

- 350 g/l Glucose
 50 3.70 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$
 175 mg/l Thiamin-HCl
 0.50 g/l L-Tryptophan
 4.0 g/l L-Leucin
 2.0 g/l L-Methionin

55

Zudosierung von Antischaummittel während der Fermentation:

(bezogen auf Fermentervolumen)

5 1.0 ml/l UCON LB625

Salze ((NH₄)₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, NaCl, NH₄Cl und Na-Citrat) wurden in einem Fermenter sterilisiert. Spurenelemente, MgSO₄, Glucose, Thiamin, L-Tryptophan, L-Leucin, L-Methionin und Tetracyclin wurden nach Abkühlung aseptisch so zugegeben, daß ein Startvolumen von 7 Litern erhalten wurde. 600 ml der Vorkultur wurden automatisch in den Fermenter überimpft. Die Fermentationsbedingungen waren: Rühren
 10 bei 1000 U/min, Belüftung von 1 vvm, 0.3 bar Überdruck, eine Temperatur von 37.0 ± 0.1 °C, der pH wurde auf 6.7 ± 0.1 mit NH₃ und H₂SO₄ gehalten. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff wurde durch Belüftung mit sauerstoffangereicherter Luft nach Bedarf oberhalb von 15% Luftsättigung (bei 0.3 bar Überdruck) gehalten. Nach Verbrauch der anfänglich vorhandenen Glucose wurde eine Fütterungsprozedur gestartet, die durch die Sauerstoffkonzentration automatisch ausgelöst wurde und Glucose, Thiamin,
 15 MgSO₄, L-Tryptophan, L-Leucin und L-Methionin enthält. Die Fütterungsgeschwindigkeit begann mit 2.5 g/l/h Glucose und wurde innerhalb von 24 Stunden kontinuierlich auf 5.0 g/l/h gesteigert und anschließend bis zum Ende des Fermentationsprozesses konstant gehalten.

Die Fermentation wurde beendet, nachdem eine Gesamtmenge von 350 g/l Glucose zugegeben worden war. Zu diesem Zeitpunkt war eine typische optische Dichte von 250 bis 280 bei 546 nm erreicht.

20 Zur Inaktivierung der Biomasse wurde der Ansatz auf etwa 10 °C gekühlt und gleichzeitig der pH-Wert mit H₂SO₄ auf 2.0 eingestellt. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation abgetrennt und bei -70 °C gefroren aufbewahrt.

Beispiel 3: Extraktion

25

Säureinaktivierte Biomasse (etwa 0.5 kg) wurde in 500 ml 1%iger Essigsäure mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators suspendiert und 1 Stunde bei 0 °C gerührt. Polyethylenimin (50%ige Stammlösung, Serva, Heidelberg) wurde bis zu einer Endkonzentration von 0.25% (w/v) zugegeben. Die Suspension wurde mit 5 N NaOH auf einen pH von 10.0 eingestellt und weitere 2 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Einstellung des
 30 pH-Wertes auf 7.5 mit 5 N HCl wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 17000 x g (Beckmann J2-21 Zentrifuge) abgetrennt. Die durchschnittliche Extraktionsausbeute betrug 29.3 ± 5.9% des Gesamtgehaltes an IFNα2c.

Beispiel 4: Chromatographische Reinigung

35

Adsorptionschromatographie auf Silicagel

Der IFNα-haltige Überstand nach der Abtrennung des Bakterienpellets in Beispiel 3 wurde auf eine Silicagel-Säule geladen (Grace, Silica Typ 953W; 35 mg Protein/ml Säulenmaterial, Flußgeschwindigkeit 25
 40 ml/min), die mit 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, equilibriert worden war. Die Säule wurde mit 30 Säulenvolumina Startpuffer gewaschen, dann folgte ein Waschschrift mit 20 mM Tris-HCl, 100 mM Tetramethylammoniumchlorid (TMAC), pH 7.5. IFNα2c konnte durch Steigerung der TMAC-Konzentration auf 800 mM TMAC eluiert werden (Fig. 3A).

45 *Hydrophobe Interaktionschromatographie*

Das Material, das von der Silicagelsäule eluiert wurde, wurde durch Zugabe von festem (NH₄)₂SO₄ auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 20% (w/v) eingestellt und auf eine Phenylsepharosesäule (Phenyl Toyopearl, 650S, Tosohaas) geladen, die mit 20 mM Tris-HCl, 30% Ammoniumsulfat equilibriert worden
 50 war. IFNα2c wurde mit einem linearen Gradienten von 100% Ladebedingungen bis 100% 20mM Tris-HCl, 30% Ethylenglykol, pH 7.5, bei einer Flußgeschwindigkeit von 15 ml/min eluiert. Die Reinheit des IFNα-Pools betrug 71 ± 15%.

Kationenaustauschchromatographie

55

Das Eluat der hydrophoben Interaktionschromatographie wurde durch extensive Dialyse auf 20 mM Na-Succinat, pH 5.0, eingestellt. Der endgültige pH wurde mit HCl auf 2.0 eingestellt, bevor die Säule mit 100 mM NaCl, pH 2.0, gewaschen wurde. IFNα2c wurde mit einem linearen Gradienten von 100% 20 mM Na-Succinat, pH 5.0, bis 100% 100 mM NaCl, pH 2.0, eluiert. Die Reinheit des IFNα-Pools betrug 71 ± 15%.

pH 5.0, geladen wurde. IFN α 2c wurde mit einem linearen Gradienten von 100% Ladebedingungen bis 100% 20 mM Na-Succinat, 500 mM NaCl, 10% Ethylenglykol, pH 5.5 (Lösungsmittel B) mit einer Flußgeschwindigkeit von 6 ml/min von der Säule eluiert. Das von dieser Säule eluierte IFN α 2c hatte routinemäßig eine größere Reinheit als 95%.

5 Anionenaustauschchromatographie

Der IFN α -Pool wurde gegen 10 mM bisTris, pH 5.8, dialysiert und auf eine DEAE-Sepharose (DEAE-Sepharose FastFlow, Pharmacia) geladen, die mit dem gleichen Puffer equilibriert war. Die Elution von IFN α 2c erfolgte mit einem linearen Gradienten auf 10 mM bisTris, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 5.8 (Lösungsmittel B), Fließgeschwindigkeit 5 ml/min.

Beispiel 5: Analyse der IFN α 2c-Präparationen

15 Reversed-Phase-HPLC

Intaktes IFN α 2c wurde mit einer BakerBond -WP- C18-Säule [250 x 4.5 mm, Partikelgröße 5 μ m] bei 30 °C analysiert. Für die Trennung von tryptischen Peptiden wurde eine Merck Supersphere 120-4 C-18-Säule [125 x 4.5 mm, Partikelgröße 4 μ m] bei 37 °C verwendet. Die Proben wurden unter Verwendung der Lösungsmittel A, 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser, und B, 0.1% Trifluoressigsäure in Acetonitril und mit den Gradienten wie in der jeweiligen Abbildungslegende beschrieben chromatographiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

25 IFN α 2c-Proben wurden auf 16%-SDS-Polyacrylamid-Gelen unter Standardbedingungen analysiert. Proben wurden vor der Elektrophorese mit Dithiotreitol reduziert. Proteinbanden wurden mit Coomassie-Blue-Färbung visualisiert.

Quantifizierung von IFN α 2c durch ELISA

30 Der IFN α 2c-Gehalt verschiedener Proben, die während der Reinigung anfielen, wurde mit einem Sandwich-ELISA mit den monoklonalen Antikörpern OMG-2 und MG-7 (Adolf *et al.*, 1990) bestimmt.

Literatur

- 35 Adolf, G.R., Virology 175, 410-417 (1990)
 Bodo, G. & Maurer-Fogy, I., in: The Biology of the Interferon System 1985 (Hrsg.: Stewart, W.E., II & Schellekens, H.), S. 59-64, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam (1985)
 Breitling R., Gerlach D., Hartmann M., Behnke D., Mol. Gen. Genet. 217, 384-391 (1989)
 40 Chang C.N., Kuang W.-J. and E.Y. Chen, Gene 44, 121-125 (1986)
 Dworkin-Rastl E., Swetly P., Dworkin M.B., Gene 21, 237-248 (1983)
 Fuh G., Mulkerrin M.G., Bass S., McFarland M., Brochier M., Bourell J.H., Light D.R., Wells J.A., J. Biol. Chem. 265, 3111-3115 (1990)
 Goeddel D.V., Yelverton E., Ullrich A., Heynecker H.L., Miozari G., Holmes W., Seeburg P.H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J.M., Gross M., Familletti P.C., Pestka S., Nature 287, 411-416 (1980)
 45 Goeddel D.V., Leung D.W., Dull T.J., Gross M., Lawn R.M., McCandliss R., Seeburg P.H., Ullrich A., Yelverton E., Gray P., Nature 290, 20-26 (1981)
 Hauptmann R. and P. Swetly, Nucl. Acids Res. 13, 4739-4749 (1985)
 50 Ho S.N., Hunt S.N., Horton R.M., Pullen J.K. and L.R. Pease, Gene 77, 51-59 (1989)
 Lee C.H., Mosely S.L., Moon H.W., Whipp S.C., Gyles C.L. and M. So, Infection and Immunity 42, 264-268 (1983)
 Mantei N., Schwarzstein M., Streuli M., Panem S., Nagata S., Weissmann C., Gene 10, 1-10 (1980)
 Picken R.N., Mazaitis A.J., Maas W.K., Rey M. and H. Heyneker, Infection and Immunity 42, 269-275 (1983)
 55 Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., "Molecular cloning - a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)
 Shuttleworth M., Taylor J. and N. Minton, Nucl. Acids Res. 14, 8689 (1986)

EP 0 626 448 A2

Streuli M., Nagata S., Weissmann C., Science 209, 1343-1347 (1980)
Thatcher D.R., Panayotatos N., Methods Enzymol. 119, 166-177 (1986)
Twigg A.J. and D. Sherratt, Nature 283, 216-218 (1980)

5

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

10 (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
- (B) STRASSE: Binger Strasse
- (C) ORT: Ingelheim
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 55218
- 15 (G) TELEPHON: 49-6132-77-2770
- (H) TELEFAX: 49-6132-77-4377

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung und Reinigung von
Interferon-alpha

20 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- 25 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beides
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGTCTTCAAG AATTCGAGAT TATCG

25

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

40

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

50

GACTTCAGAA GCTTCTGCAG TTACGATCGT TATCATTCCCT TACTTCTTAA ACTTTC

56

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 55 (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATGCCTATGC ATGTGATCTG CCTCAAACCC ACAGC

35

10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

20

GGCAGATCAC ATGCATAGGC ATTTGTAGCA ATAG

34

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 165 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
1 5 10 15

35

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
20 25 30

Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
35 40 45

40

Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
50 55 60

Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
65 70 75 80

45

Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
85 90 95

Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100 105 110

50

Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115 120 125

Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg

55

EP 0 626 448 A2

55

•

5

1

10

15

20

40

45

50

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

EP 0 626 448 A2

GAATTCGAGA TTATCGTCAC TGCAATGCTT CGCAATATGG CGCAAAATGA CCAACAGCGG 60
 TTGATTGATC AGGTAGAGGG GGCGCTGTAC GAGGTAAAGC CCGATGCCAG CATTCTGAC 120
 5 GACGATACGG AGCTGCTGCG CGATTACGTA AAGAAGTTAT TGAAGCATCC TCGTCAGTAA 180
 AAAGTTAATC TTTTCAACAG CTGTCATAAA GTTGTACACG CCGAGACTTA TAGTCGCTTT 240
 GTTTTTATTT TTTAATGTAT TTGCTCGAGA GGTGAGGTG ATTTTATGAA AAAGAATATC 300
 10 GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT TCTATTGCTA CAAATGCCTA TGCATGTGAT 360
 CTGCCTCAAA CCCACAGCCT GGGTAGCAGG AGGACCTTGA TGCTCCTGGC ACAGATGAGG 420
 AGAATCTCTC TTTTCTCCTG CTTGAAGGAC AGACGTGACT TTGGATTTC CCAGGAGGAG 480
 15 TTTGGCAACC AGTTCCAAAA GGCTGAAACC ATCCCTGTCC TCCATGAGAT GATCCAGCAG 540
 ATCTTCAATC TCTTCAGCAC AAAGGACTCA TCTGTGCTT GGGATGAGAC CCTCCTAGAC 600
 AAATTCTACA CTGAACTCTA CCAGCAGCTG AATGACCTGG AAGCCTGTGT GATACAGGGG 660
 20 GTGGGGGTGA CAGAGACTCC CCTGATGAAG GAGGACTCCA TTCTGGCTGT GAGGAAATAC 720
 TTCCAAAGAA TCACTCTCTA TCTGAAAGAG AAGAAATACA GCCCTTGTGC CTGGGAGGTT 780
 GTCAGAGCAG AAATCATGAG ATCTTTTTTCT TTGTCAACAA ACTTGCAAGA AAGTTTAAGA 840
 AGTAAGGAAT GATAACGATC GTAAGTGCA 869

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 1177 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - 30 (C) STRANGFORM: beides
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
- (ix) MERKMALE:
 - 35 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 286..873
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Cytokine"
 - /product= "Interferon-omega1"
- (ix) MERKMALE:
 - 40 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 - (B) LAGE: 355..873
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Cytokine"
 - /product= "Interferon-omega"
- (ix) MERKMALE:
 - 45 (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 - (B) LAGE: 286..354
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "ST II Leader"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

50 GAATTGGAGA TTATCGTCAC TGCAATGCTT CGCAATATGG CGCAAAATGA CCAACAGCGG 60

EP 0 626 448 A2

	TTGATTGATC AGGTAGAGGG GCGCGTGTAC GAGGTAAAGC CCGATGCCAG CATTCCTGAC	120
	GACCATACCG AGCTGCTGCG CGATTACGTA AAGAAGTTAT TGAAGCATCC TCGTCAGTAA	180
5	AAAGTTAATC TTTTCAACAG CTGTCATAAA GTTGTCACGG CCGAGACTTA TAGTCGCTTT	240
	GTCTTTAATT TTTAATGTAT TTGCTCGAGA GGTGAGGTG ATTTT ATG AAA AAG	294
	Met Lys Lys -23	
10	AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA	342
	Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr	
	-20 -15 -10 -5	
	AAT GCC TAT GCA TGT GAT CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG	390
	Asn Ala Tyr Ala Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg	
	1 5 10	
15	AAC ACC TIG GTG CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG	438
	Asn Thr Ile Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu	
	15 20 25	
	TGT CTC AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA	486
20	Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys	
	30 35 40	
	GCG ACC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAG ATG	534
	Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met	
	45 50 55 60	
25	CTC CAC CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC TCC TCT GCT GCC	582
	Leu Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala Ala	
	65 70 75	
	TCT AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT CAT CAG CAA	630
30	Thr Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu His Gln Gln	
	80 85 90	
	CTC AAC CAG CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG GGA GAA GGA GAA	678
	Leu Asn His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly Glu Gly Glu	
	95 100 105	
35	TCT CTT GCG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC TTG AGG AGG TAC TTC	726
	Ser Asn Gln Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu Arg Arg Tyr Phe	
	115 120	
	CAC CAA AAT CST GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC GAC TGT GCC	774
40	Gln Gln Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala	
	130 135 140	
	TCT AAC CAG GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA TCC TTG TTC TTA TCA ACA	822
	Leu Asn His Val Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr	
	145 150 155	
45	AA AAT CAG AGA CTG AGA AGT AAA GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT	870
	Asn Asn His Glu Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser	
	160 165 170	
	TCATAT CTTTATTGATT AATTGCCAT ATAACACTTG CACATGTGAC TCTGGTCAAT	930
	TGCTTATTTTCGG CTTTAATCAC AGAATTGACT GAATTAGTTC TGCAAATACT	990
50	TTT TAT ATTAAGCCAG TATATGTTAA AAAGACTTAG GTTCAGGGGC ATCAGTCCCT	1050

EP 0 626 448 A2

AAGATGTTAT TTATTTTAC TCATTTATTT ATTCTTACAT TTTATCATAT TTATACTATT 1110
TATATTCTTA TATAACAAAT GTTTCCTTT ACATTGTATT AAGATAACAA AACATGTTCA 1170
5 GGATCCA 1177

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
10 (A) LÄNGE: 195 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
-23 -20 -15 -10
Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu
-5 1 5
20 Leu Ser Arg Asn Thr Leu Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser
10 15 20 25
Pro Phe Leu Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu
30 35 40
25 Met Val Lys Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu
45 50 55
His Glu Met Leu Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser
60 65 70
30 Ser Ala Ala Trp Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu
75 80 85
His Gln Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly
90 95 100 105
35 Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu Arg
110 115 120
Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser
125 130 135
40 Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu Phe
140 145 150
Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp Leu
155 160 165
45 Gly Ser Ser
170

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
50 (A) LÄNGE: 879 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: beides

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 286..852

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE: 355..852

(D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "Cytokine"
/product= "Interferon-alpha-2c"

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide

(B) LAGE: 286..354

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "ST II Leader"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

20	GAATTCGAGA TTATCGTCAC TGCAATGCTT CGCAATATGG CGCAAAATGA CCAACAGCGG	60
	TTCATTGATC AGGTAGAGGG GGCCTGTAC GAGGTAAAGC CCGATGCCAG CATTCCTGAC	120
	GACGATACGG AGCTGCTGCG CGATTACGTA AAGAAGTTAT TGAAGCATCC TCGTCAGTAA	180
25	AAAGTTAATC TTTTCAACAG CTGTCATAAA GTTGTACGG CCGAGACTTA TAGTCGCTTT	240
	GTTTTTATTT TTTAATGTAT TTGCTCGAGA GGTGAGGTG ATTTT ATG AAA AAG	294
	Met Lys Lys	
	-23	
30	AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA	342
	Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr	
	-20 -15 -10 -5	
	AAT GCC TAT GCA TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG	390
	Asn Ala Tyr Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg	
	1 5 10	
35	AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC	438
	Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser	
	15 20 25	
40	TGC TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC	486
	Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly	
	30 35 40	
	AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC	534
	Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile	
	45 50 55 60	
45	CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT TGG	582
	Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp	
	65 70 75	
	GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG	630
	Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu	
50	80 85 90	
	AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT	678

EP 0 626 448 A2

	Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr	
	95 100 105	
5	CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln	726
	110 115 120	
	AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp	774
	125 130 135 140	
10	GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn	822
	145 150 155	
	TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGATAACGAT CGTAACTGCA Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu	869
15	160 165	
	GAAGCTTAAT	879

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 188 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

	Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser	
	-23 -20 -15 -10	
30	Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu	
	-5 1 5	
	Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser	
	10 15 20 25	
35	Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu	
	30 35 40	
	Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His	
	45 50 55	
40	Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser	
	60 65 70	
	Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr	
	75 80 85	
	Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val	
	90 95 100 105	
45	Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys	
	110 115 120	
	Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro	
	125 130 135	
50	Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu	

55	140	145	150
	Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu		
	155	160	165

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Interferon- α durch Expression in *E. coli*, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) Interferon- α exprimiert wird in Zellen, die einen Vektor enthalten, in dem die Signalsequenz des Gens für das hitzestabile Enterotoxin II (STII) aus *E. coli* verknüpft ist mit einer Sequenz, die für reifes menschliches Interferon- α kodiert
 - b) das exprimierte Interferon- α isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor zusätzlich einen Promotor für die alkalische Phosphatase (*phoA*) aus *E. coli* enthält.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor zusätzlich die Sequenz für die Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung des Interferons die Schritte
 - a) Adsorptionschromatographie auf Silicagel
 - b) Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
 - c) Kationenaustauschchromatographie
 - d) Anionenaustauschchromatographie enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Interaktionschromatographie auf einer Phenylsepharose durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Kationenaustauschchromatographie auf einem Sulfopropyl-Ionenaustauscher durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Anionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Sephadex durchgeführt wird.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α Interferon- α 2 ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α 2 die Aminosäuresequenz

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
 Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser
 Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu
 His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys
 Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
 Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys
 Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp
 Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

enthält.

10. Verfahren zur Reinigung von Interferon- α , dadurch gekennzeichnet, daß es die Schritte

- a) Adsorptionschromatographie auf Silicagel
- b) Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
- c) Kationenaustauschchromatographie
- d) Anionenaustauschchromatographie

5 enthält.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophobe Interaktionschromatographie auf einer Phenylsepharose durchgeführt wird.
- 10 12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Kationenaustauschchromatographie auf einem Sulfopropyl-Ionenaustauscher durchgeführt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Anionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Sephadex durchgeführt wird.
- 15 14. Verfahren nach Ansprüchen 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α bakteriell exprimiert wurde.
15. Verfahren nach den Ansprüchen 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α Interferon- $\alpha 2$ ist.
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- $\alpha 2$ die Aminosäuresequenz

25 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr
 Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser
 Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu
 Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu
 30 His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys
 Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
 Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys
 35 Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
 Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
 Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp
 40 Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser
 Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

enthält.

- 45 17. Vektor zur Expression von Interferon- α in *E. coli*, dadurch gekennzeichnet, daß er die Signalsequenz des STII-Gens in Verknüpfung mit einer Sequenz enthält, die für reifes menschliches Interferon- α kodiert.
- 50 18. Vektor nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich einen *phoA*-Promotor enthält.
19. Vektor nach den Ansprüchen 17 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich die Ribosomenbindungsstelle des STII-Gens enthält.
- 55 20. Vektor nach den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferon- α Interferon- $\alpha 2$ ist.
21. Vektor nach den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er die Nukleotidsequenz

TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC
 TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC
 5 TGC TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG
 TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC
 CAT GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG
 10 GAC TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC
 TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT
 GTG ATA CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG
 GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC
 15 ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG
 GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA
 ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA

oder eine Sequenz, die zu dieser Sequenz zu mehr als 70 % homolog ist und für Interferon- α kodiert, enthält.

22. Vektor nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß er die Nukleotidsequenz

GAATTCGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAG
 CGGTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATT
 30 CCTGACGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCT
 CGTCAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACT
 TATAGTCGCTTTGTTTTTATTTTTTAATGTATTTGCTCGAGAGGTTGAGGTGATTTT
 ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT
 35 TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT CTG CCT CAA
 ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA
 CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG AAG GAC AGA
 40 CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC
 CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG
 CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT
 45 TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC
 CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG
 50 GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG
 GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA
 GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA
 55 GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA
 AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGATAACGATCGTAACTGCA

enthält.

23. Verwendung des Vektors gemäß einem der Ansprüche 17 bis 22 zur Herstellung von Interferon- α .

5

10

15

20

25

30

35

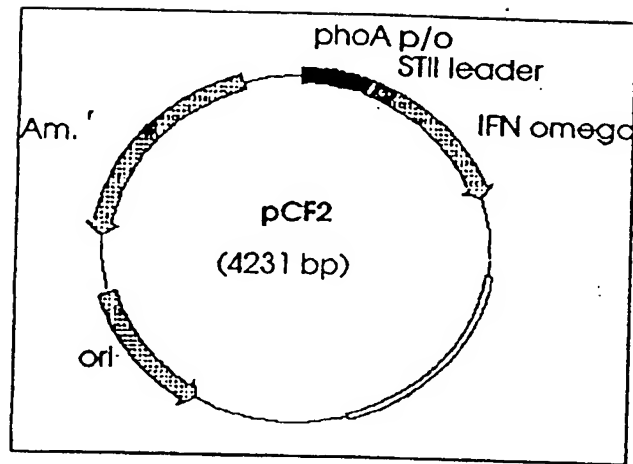
40

45

50

55

A)



B)

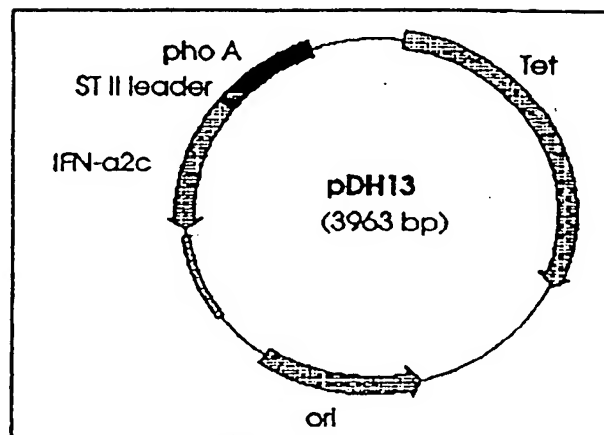
```

gaattggagattatcgctcactgcaatgcttcgcaatatggcgcaaaatgaccaac 55
agcgggttgattgatcaggtagagggggcgctgtacgaggtaaagcccgatgccag 110
cattcctgacgacgatacggagctgctgcgcgattacgtaaagaagttattgaag 165
catcctcgtcagtaaaaagttaatcttttcaacagctgtcataaagttgtcacgg 220
ccgagacttatagtcgctttgtttttatatttttaaatgtatttgctcgagaggttg 275
aggtgatttt  ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT 318
                M   K   N   I   A   F   L   L   A   S
ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT 11
M   F   V   F   S   I   A   T   N   A   Y   A   C   D   360
CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC TTG GTG 25
L   P   Q   N   H   G   L   L   S   R   N   T   L   V   402
CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT CTC 39
L   L   H   Q   M   R   R   I   S   P   F   L   C   L   444
AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA 53
K   D   R   R   D   F   R   F   P   Q   E   M   V   K   486
GGG AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT 67
G   S   Q   L   Q   K   A   H   V   M   S   V   L   H   528
GAG ATG CTG CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC 81
E   M   L   Q   Q   I   F   S   L   F   H   T   E   R   570
TCC TCT GCT GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC 95
S   S   A   A   W   N   M   T   L   L   D   Q   L   H   612
ACT GGA CTT CAT CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG 109
T   G   L   H   Q   Q   L   Q   H   L   E   T   C   L   654
CTG CAG GTA GTG GGA GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC 123
L   Q   V   V   G   E   G   E   S   A   G   A   I   S   696
AGC CCT GCA CTG ACC TTG AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT 137
S   P   A   L   T   L   R   R   Y   F   Q   G   I   R   738
GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA 151
V   Y   L   K   E   K   K   Y   S   D   C   A   W   E   780
GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA TCC TTG TTC TTA TCA ACA 165
V   V   R   M   E   I   M   K   S   L   F   L   S   T   822
AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA GAT AGA GAC CTG GGC 179
N   M   Q   E   R   L   R   S   K   D   R   D   L   G   864
TCA TCT TGA aatgattctcattgattaatttgccatataacacttgcatg 916
S   S   *
tgactctggtcaattcaaaagactcttattttcggttttaatcacagaattgactg 196
aattagttctgcaaatactttgtcggtatattaagccagtatatgttaaaaagac 971
ttaggttcaggggcatcagtcacctaaagatgttatttttttactcatttattta 1026
ttcttacattttatcatatttatactattttatattcttatataacaaatgtttgc 1081
ctttacattgtattaagataacaaaacatgttcaggatcc 1136
                                                1176

```

Fig. 1

A)



B)

EcoRI

gaattcgagattatcgctcactgcaatgcttcgcaatatggcgcaaaatgaccaac 55
 agcgjttgattgatcaggtagagggggcgctgtacgaggtaaagcccgatgccag 110
 cattccrgacgacgatacggagctgctgcgcgattacgtaaagaagttattgaag 165
 catccrqr cagtaaaaagttaatcttttcaacagctgtcataaagttgtcacgg 220

XhoI

ccgagacttatagtcgctttgtttttatttttttaaatgtatttgctcgagaggttg 275

STII Leader peptide ->

aggtgatttt ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT 318
 M K K N I A F L L A S 11

IFNα2c ->

ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT 360
 M F V F S I A T N A Y A C D 25
 CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG 402
 L P Q T H S L G S R R T L M 39
 CTC CTG CCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG 444
 L L A Q M R R I S L F S C L 53
 AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC 486
 K D R R D F G F P Q E E F G 67
 AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG 528
 N C F Q K A E T I P V L H E 81
 ATG ATT CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA 570
 M I Q Q I F N L F S T K D S 95
 TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT 612
 S A A W D E T L L D K F Y T 109
 GAA CTT TAT CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA 654
 E L Y Q Q L N D L E A C V I 123
 CAG GAG GAG CCG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC 696
 Q A V G V T E T P L M K E D 137
 TCC ATT TAT GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC 738
 S I A V R K Y F Q R I T L 151
 TAT CTT AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT 780
 Y L F E K K Y S P C A W E V 165
 GTC AAA TAA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC 822
 V F A E I M R S F S L S T N 179

PvuI

PstI

TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA tgataacgatcgtaactgc 868
 L Q E S L R S K E 188

HindIII

agaagctt 876

Fig. 2

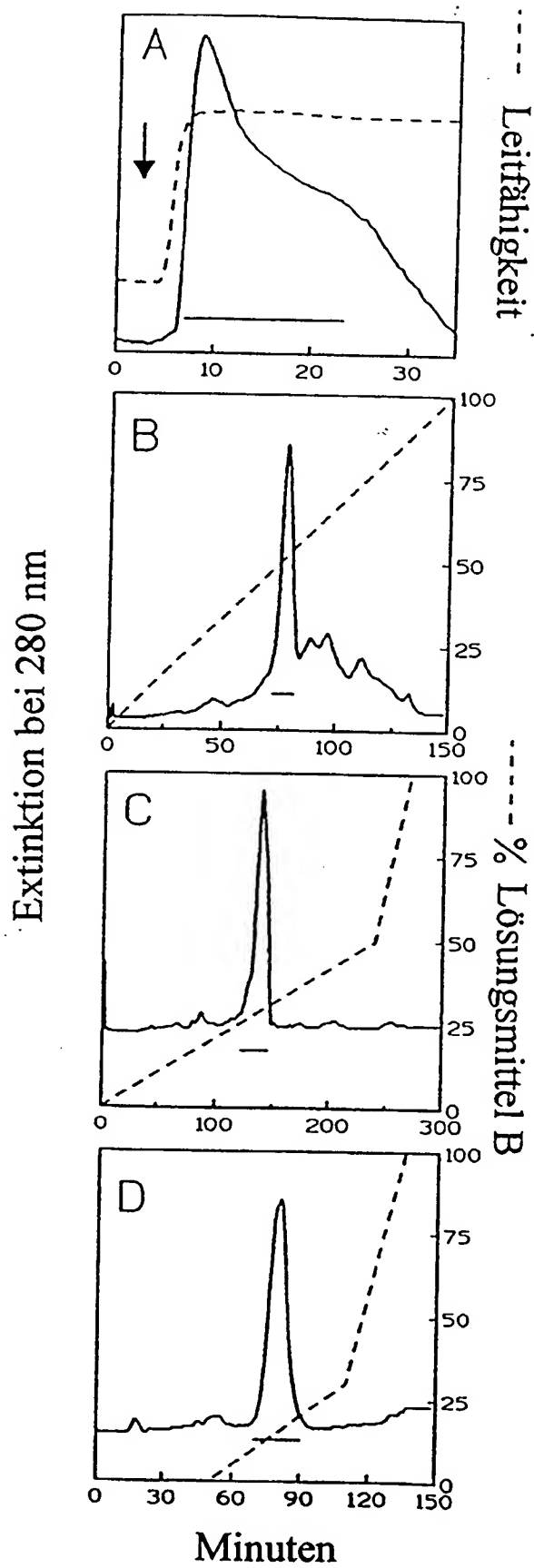


Fig. 3

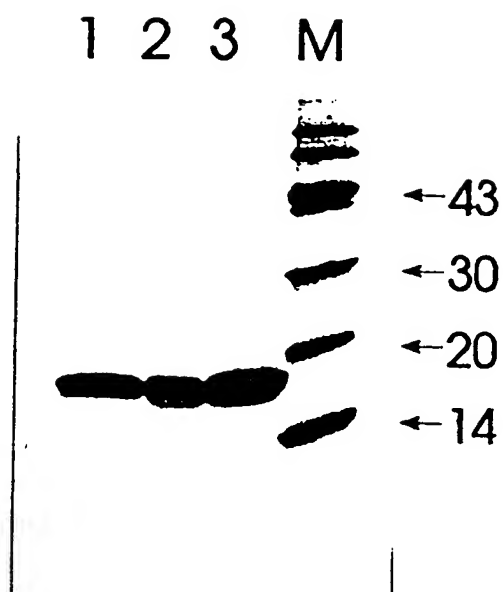


Fig. 4

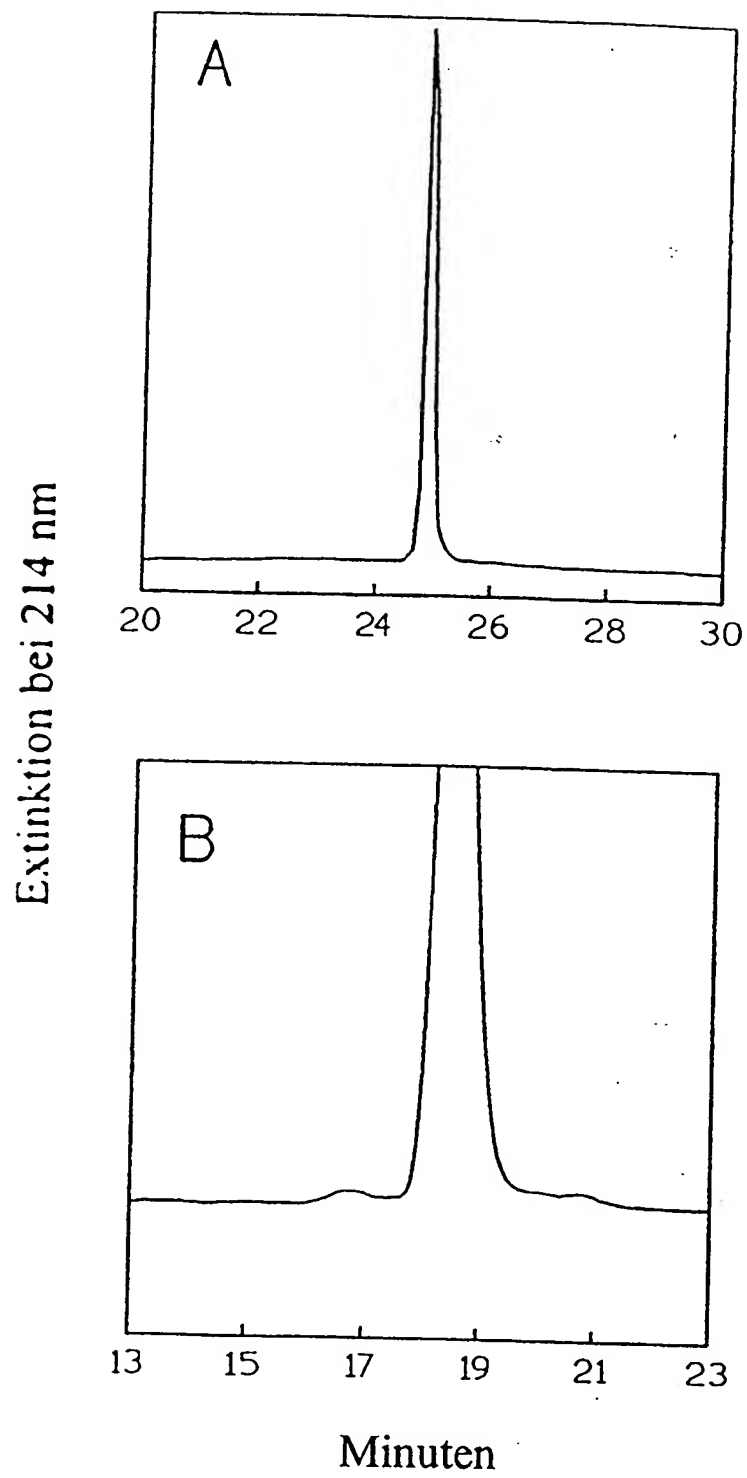


Fig. 5